

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893263

研究課題名(和文) 骨再生医療に向けたヒト歯嚢由来細胞シートの分子生物学的検討

研究課題名(英文) Molecular biological study of cells sheet derived from human dental follicle for bone regenerative medicine

研究代表者

高橋 康輔 (TAKAHASHI, Kosuke)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号：30705687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：歯嚢は歯科治療の際に破棄される組織で、未分化間葉系幹細胞の存在することが報告されている。歯嚢から分離したヒト歯嚢由来細胞は、骨芽細胞誘導培地で培養すると石灰化する。患者に新たな侵襲を加えることなく、従来破棄する組織から、組織再生に使用可能な細胞を得られることは、有益であると考えられる。一方、近年組織再生の分野では、細胞シートが注目されている。単層培養した細胞を積層する細胞シートは、細胞が分泌する細胞外マトリックスの分泌が豊富であり、生体に速やかに生着する特徴を有する。本申請では、歯嚢細胞を細胞培養シートで培養した際の石灰化能を調べ、将来の骨再生医療ソースとしての有用性を検討することである。

研究成果の概要(英文)：The dental follicle is an ectomesenchymally derived from the neural crest, which has connective tissue surrounding the tooth germ that contains stem cells and/or progenitor cells of the periodontium. Human dental follicle cells (hDFCs) have the ability to mineralize under in vitro culture using osteogenic induction medium. Cell sheet engineering is an emerging technology that is being researched for several tissue. This technique involves culturing cells to hyperconfluence and inducing matrix production for the formation of a robust tissue sheet. In this study, we investigate the ability of cell sheet derived from dental follicle cells for bone regeneration

研究分野：骨再生

キーワード：歯嚢細胞 細胞シート 骨再生 未分化間葉系幹細胞 石灰化能

1 研究開始当初の背景

近年、再生医療に対する期待は高まると同時に目覚ましい発展を遂げてきた。未分化間葉系幹細胞を用いた再生医療もその1つであるが、未だ幹細胞の確保に問題がある。幹細胞の再生医療応用の実現には、幹細胞を生体侵襲が少ない細胞供給源から確保することが求められている。歯嚢は、歯科治療の過程で破棄される組織で、未分化間葉系幹細胞が存在することが報告され、ヒト歯嚢から分離した細胞 (human dental follicle cells:hDFCs) を骨芽細胞誘導培地で培養すると骨芽細胞分化および石灰化することが報告されている。従来破棄される組織から骨再生医療に応用される細胞を得られることは有益であると考え、患者の身体負担を軽減出来ると考える。

一方、単層培養した細胞を積層する細胞シートは、生体組織へ速やかに生着する特徴を有し、より生体に近い細胞生存環境を再現できることが報告され、新たな再生医療技術として期待されている。

hDFCs を細胞シートで培養した際の石灰化能および石灰化過程での生物学的性質を解析することは、将来の骨再生医療細胞供給源としての有用であると考えられる。

2 研究の目的

本申請では、hDFCs を細胞シートで培養した際の石灰化能および石灰化過程での分子生物学的性質を解析し、将来の骨再生医療の細胞源としての有用性を検討することである。

(1) hDFCs の石灰化能の評価

in vivo および *in vitro* における歯嚢細胞の石灰化能を検討する。

(2) 歯嚢由来細胞シートの作製

歯嚢由来細胞を温度応答性培養表面上で培養、移植手技に耐えうる培養細胞シートの最適な播種条件、培養条件等を検討する。

(3) 歯嚢由来細胞シートの移植

作製した歯嚢由来細胞シートをラット下顎正中中部骨欠損部に移植し新生骨形成能を検討する。

3 研究の方法

(1) hDFCs の分離・培養

埋伏智歯抜歯の際に採取したヒト歯嚢を Collagenase/dispase 処理し、歯嚢由来細胞を分離し、初代培養および継代培養を行った。

(2) *in vitro* での hDFCs 石灰化能

in vitro での歯嚢細胞の石灰化能を検討するため、アリザリン染色、フォンコッサ染色およびアルカリフォスファターゼ活性を測定した。

(2) hDFCs のラット頭頂骨上への移植

In vivo での歯嚢細胞の新生骨形成能を検討するため生後 9 週齢 F344/Ncl-rnu/rnu 雄性ラットの頭頂部頭蓋骨面と骨膜間に PTFE Tube を設置し、歯嚢細胞を播種した。

(3) 歯嚢由来細胞シートの作成

hDFC を UpCell (Cell Seed) に播種し、OIM で培養した。コンフルエントから 14 日目に細胞シートを作製した。CO₂ incubator から取り出し、培地を除去、細胞が乾燥しない程度に 50μl の培地を加えた。細胞の上に Cell Shifter を重ね、室温で 5 分間放置した後、ピンセットを用いて細胞シートと Cell Shifter を一塊にして回収した。回収した細胞シートと Cell Shifter は培地溶液中で剥離した。

(4) 細胞シートのラット下顎正中中部への移植

歯嚢由来細胞シートの新生骨形成能を検討するため生後 9 週齢 F344/Ncl-rnu/rnu 雄性ラットの下顎正中中部骨欠損部に作成された細胞シートを設置した。

(5) 組織学的観察

ラット頭頂骨移植 hDFCs および歯嚢由来細胞シートは、10%中性ホルマリン水溶液を用いて固定した。ラット頭頂骨移植 hDFCs 移植頭蓋骨は 10%EDTA で脱灰を行い矢状断に割断しパラフィン包埋をおこなった。歯嚢由来細胞シートはエタノール処理後キシレンに浸漬し、脱水処理を行ったところでパラフィン包埋を施し、標本作製した。切片は H-E 染色を施し観察した。

(6) Micro-CT による解析

ラット頭頂骨移植 hDFCs およびラットオトガイ下部骨欠損移植細胞シートはラット安楽死後、Micro-CT (R-mCT,Rigaku Coporation) を用いて撮影した。

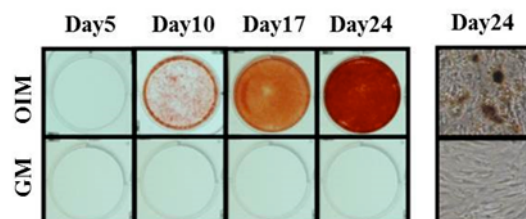
(7) 骨梁構造解析

撮影されたラット頭頂骨移植 hDFCs は骨梁構造解析ソフト TRI/3D-Bon (Ratoc System engineering) を用いて処理し、骨の微細構造を観察した。

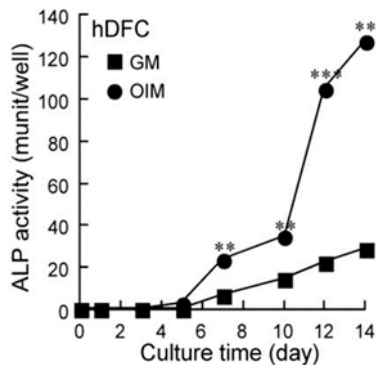
4. 研究成果

(1) *in vitro* での hDFCs 石灰化能

hDFCs を骨芽細胞誘導培地で培養し、石灰化をアリザリン染色およびフォンコッサ染色および ALP 活性を測定した。



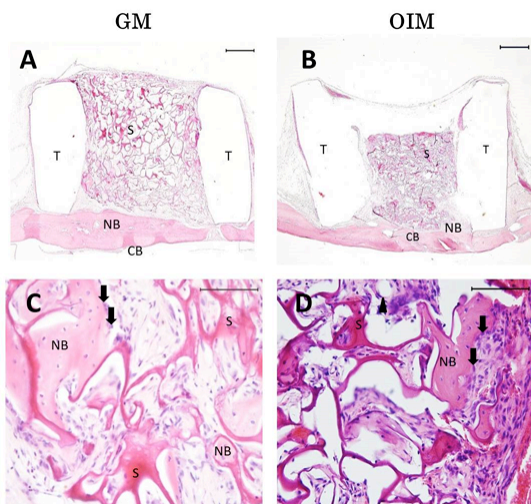
hDFCs を骨芽細胞誘導培地で培養すると 10 日目よりアリザリン染色陽性となり、24 日目ではフォンコッサ染色陽性となった。



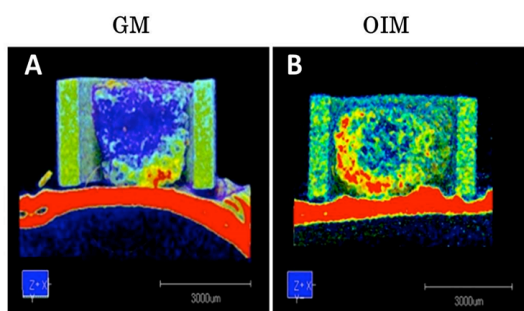
hDFCs を骨芽細胞誘導培地で培養するとアルカリフォスファターゼ活性の上昇が認められた。

(2) *in vivo* での hDFCs 石灰化能

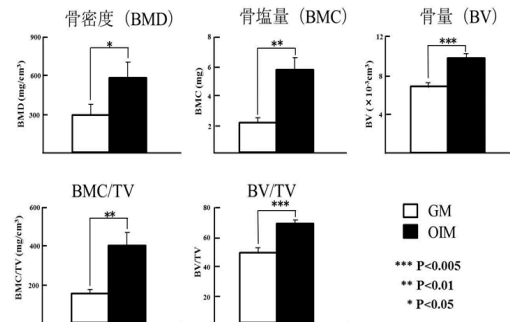
In vivo での歯囊細胞の新生骨形成能を検討するためラットの頭頂部頭蓋骨面と骨膜間に PTFE Tube を設置し、hDFCs を播種した。術後 4 週目に屠殺し、組織学的観察および micro-CT により解析した。



hDFCs 移植後の H-E 染色像。A,B ; ×40, Bars=500μm, C,D ; ×200, Bars=100μm, hDFCs を骨芽細胞誘導培地で培養し、ラット頭頂骨に移植した結果、増殖培地で培養した群よりもより広範囲の新生骨形成を認めた。また新生骨周囲辺縁には骨芽細胞の配列が確認された。



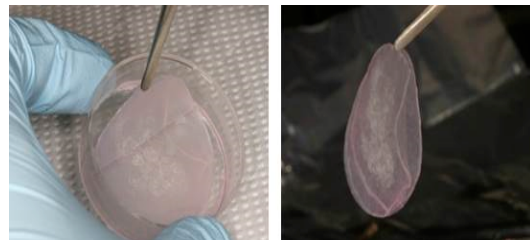
Micro-CT 画像分析から骨密度(BMD 値)を疑似カラー3D 画像表示した結果、骨芽細胞誘導培地で培養した hDFCs は増殖培地群に比べより広範囲の新生骨形成を認めた。また新生骨は頭頂骨側より形成を認めた。



骨梁構造解析結果、骨芽細胞誘導培地で培養した hDFCs は増殖培地群に比べ、骨密度、骨塩量および骨量で増殖培地群と比較し有意に高値を示した。

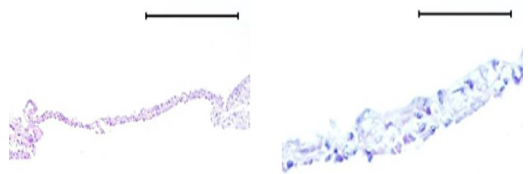
(3) 歯囊由来細胞シートの作製

hDFCs を UpCell (Cell Seed) に播種し、OIM で培養した。コンフルエントから 14 日目に細胞シートを作製したところ、形体保持、操作性において優れていた。室温で 5 分間放置した後、ピンセットを用いて細胞シートと Cell Shifter を一塊にして回収した。回収した細胞シートと Cell Shifter は培地溶液中で剥離した。



UpCell 上で培養した hDFCs に、CellShifter を重ねた。hDFCs は、CellShifter にてシート状に剥離することが可能であった

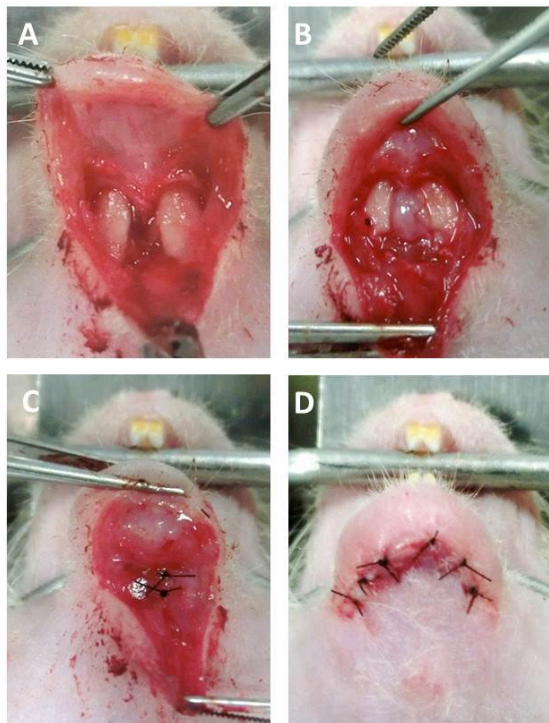
作成した細胞シートにパラフィン包埋を施し、標本作製した、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。



細胞シート断面 (右) ×10 Bar = 400 μm
細胞シート断面 (左) ×40 Bar = 100 μm
歯囊由来細胞シートは、シート状に増殖し、場所により hDFCs が重層化していた。

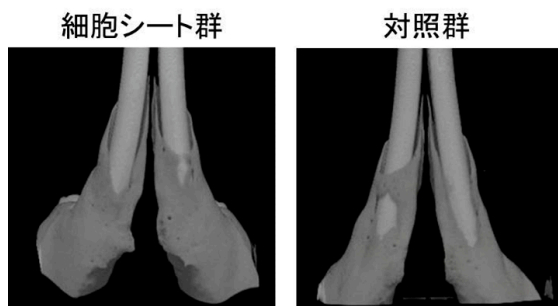
(4) 歯嚢由来細胞シートのラット下顎正中骨欠損部への移植

歯嚢由来細胞シートの新生骨形成能を検討するため生後 9 週齢 F344/Ncl-rnu/rnu 雄性ラットの下顎正中骨欠損部に作製された細胞シートを設置した。



(6) Micro-CT による解析

ラットオトガイ下部骨欠損部に対し歯嚢由来細胞シートを移植し、術後 4 週でラット安楽死後、Micro-CT (R-mCT, Rigaku Coporation) を用いて撮影した。



歯嚢由来細胞シート群では、骨欠損部周囲骨より欠損部に軽度の新生骨の増成を認める。一方対照群では新生骨の形成はほとんど認められなかった。

(7) 考察

歯嚢細胞は In vivo および In vitro において、骨芽細胞誘導培地で培養すると骨芽細胞に分化することが明らかとなった。さらに歯嚢細胞を細胞シート状に作製し、骨欠損部に補填する事で新生骨が形成することが明らかとなった。

5 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Tomoki R, Ogura N, Takahashi K, Ito k, kondoh T, MicroRNA-29 Family Suppresses Mineralization in Dental Follicle Cells. *Journal of Hard Tissue Biology* (査読あり)24(1):23-28.2015
- ② Takahashi K, Ogura N, Tomoki R, Eda T, Okada H, Kato R, Iwai S, Ito K, Kuyama K, Kondoh T. Applicability of human dental follicle cells to bone regeneration without dexamethasone: an in vivo pilot study. *Int J Oral Maxillofac Surg* (査読あり) 44(5):664-669, doi:10.1016/j.ijom.2014.11.06, 2014

[学会発表] (計 8 件)

- ① Ogura N, Takahashi K, Tomoki R, Ito K, Kondoh T, Effect of miR-29 in dental follicle cells during osteogenic differentiation, International association for dental research, General session, 2015, 3.11, Boston, USA
- ② Okada H, Ogura N, Takahashi K, Tomoki R, Eda T, Kanao S, Tsukahara H, Ito K, Kondoh T, Effect of PRGF on mineralization of human dental follicle cells, International association for dental research, General session, 2015, 3.11, Boston, USA
- ③ Takahashi K, Ogura N, Kato R, Tomoki R, Eda T, Okada H, Ito K, Kondoh T, Gene expression of semapholin 7A in human dental follicle cells, American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons 96th annual meeting, scientific session and exhibition, 2014, 9,10, Hawaii, USA
- ④ 友木里沙, 加藤良一, 高橋康輔, 小倉直美, 岡田仁恵, 枝卓志, 金尾真吾, 青木暁宣, 伊藤耕, 近藤壽郎, ヒト歯嚢由来細胞の石灰化過程における semapholin 7A の発現, 日本口腔外科学会, 2014, 10, 18, 幕張, 千葉
- ⑤ 友木里沙, 小倉直美, 高橋康輔, 岡田仁恵, 伊藤耕, 近藤壽郎, ヒト歯嚢由来細胞の骨芽細胞分化過程における microRNA-204 の影響, 日本骨代謝学会, 2014, 7, 24, 大阪, 大阪府
- ⑥ 岡田仁恵, 小倉直美, 高橋康輔, 友木里沙, 枝卓志, 金尾真吾, 塚原宏泰, 伊藤耕, 近藤壽郎, 歯嚢細胞の石灰化に対する

る PRGF の影響, 日本口腔科学会, 2014,
5,8,新宿, 東京都

- ⑦ 友木里沙, 小倉直美, 高橋康輔, 岡田仁
恵, 伊藤 耕, 近藤壽郎, ヒト歯嚢由来
細胞の骨芽細胞分化過程における網羅的
microRNA 発現解析, 日本口腔外科学会,
2013,10,12,横浜, 神奈川

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 康輔 (TAKAHASHI, Kosuke)

日本大学・松戸歯学部・助教

研究者番号 : 30705687